



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschrift
⑩ DE 42 38 778 A 1

②1 Aktenzeichen: P 42 38 778.7
②2 Anmeldetag: 12. 11. 92
④3 Offenlegungstag: 19. 5. 94

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/85
C 12 N 15/86
A 61 K 48/00
// C12N 15/52,15/11,
15/28,15/21,15/23,
15/24,15/26,15/66,
1/21,15/54

DE 42 38 778 A 1

⑦1 Anmelder:

Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:

Stein, Ulrike, Dr., O-1115 Berlin, DE; Walther,
Wolfgang, Dr., O-1115 Berlin, DE

⑤4 Vektor zur Expression von therapeutisch relevanten Genen

⑤7 Die Erfindung hat das Ziel, die Krebstherapie effektiver und damit erfolgreicher zu gestalten. Dieses Ziel wird mit einem Vektor zur Expression von therapeutisch relevanten Proteinen auf der Basis von Konstrukten, die für eine Expression in Säugerzellen geeignet sind, erreicht. Der erfindungsgemäße Vektor ist durch einen Zytostatika-induzierbaren *mdr1*-Promoter bzw. einer definierten Sequenz davon, einem für ein therapeutisch relevantes Protein kodierendes Gen und gegebenenfalls vor oder nach dem Gen angeordnete *mdr1*-Enhancer-Elemente gekennzeichnet.

DE 42 38 778 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 94 408 020/439

4/46

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Vektor und seine Verwendung zur Expression von therapeutisch relevanten Genen in Säugerzellen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

Bei der Behandlung von Krebspatienten mit Zytostatika treten oftmals Resistenzerscheinungen auf (Igor B. Roninson. *Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumor cells*. Plenum Press, New York and London, 1991), die dem Therapieerfolg hinderlich sind. Es wurden deshalb viele verschiedene Chemotherapie-Regime mit Variationen der Zytostatika-Applikation und deren Dosierung entwickelt. Darüberhinaus ist eine Verbesserung der Chemotherapie durch Kombinationen von Zytostatika mit anderen Substanzklassen, wie z. B. Cytokinen, monoklonalen Antikörpern etc. versucht worden. Ein weiterer Weg für eine effektivere Gestaltung einer Tumorchemotherapie besteht im Einsatz von Antikörper-gekoppelten Zytostatika, um damit einen Transport des Zytostatikums zur Krebszelle und ein Wirksamwerden in dieser Zelle zu erreichen (H. M. Pinodo et al. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers*, Annual 12. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1991). Trotz einiger Teilerfolge konnte jedoch ein durchgreifender klinischer Erfolg noch mit keiner dieser Methoden erreicht werden.

Die Erfindung hat das Ziel, die Krebstherapie effektiver und somit erfolgreicher zu gestalten. Die Aufgabe besteht insbesondere darin, ein eingesetztes Therapeutikum (Zytostatikum) mit einem zweiten Therapeutikum (antitumoral wirkendes Protein), das erst in den Krebszellen entsteht und somit unmittelbar auf die Krebszelle wirkt, zu kombinieren.

Das Ziel der Erfindung wird mit der Verwendung eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 1 erreicht, durch die Unteransprüche 2–5 wird der erfindungsgemäße Vektor näher gekennzeichnet. Die Verwendung des Vektors erfolgt gemäß Anspruch 6.

Die Erfindung nutzt die Eigenschaft des *mdr1*-Gens aus, daß sein Genprodukt P-Glykoprotein (verantwortlich für den Resistenztyp der Arzneimittel-Vielfachresistenz) durch Zytostatika wie Vincristin und Adriamycin induzierbar ist. Diese Zytostatika-induzierte Genexpression wird über bestimmte Promoter- und Enhancer-Elemente des *mdr1*-Gens vermittelt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß diese Promoter- und Enhancer-Elemente auch in der Lage sind, andere Gene — z. B. Gene von therapeutischem Interesse wie Cytokin-Gene oder Gene für monoklonale Antikörper — zu exprimieren. Der erfindungsgemäße Vektor gemäß Anspruch 1 ermöglicht damit eine Zytostatika-induzierte Fremdgenexpression in der Körperzelle und somit eine Kombination von Chemo- und Immuntherapie "vor Ort".

Als Grundgerüst für die erfindungsgemäßen Vektoren sind alle Konstrukte verwendbar, die für eine Expression in Säugerzellen geeignet sind, wobei neben z. B. Adenovirus-Vektoren vor allem retroviralen Expressionsvektoren (N2A, pM3-neo, pM5-neo) der Vorrang gegeben wird. Die Vektorkonstruktionen werden gezielt mit einem tumorspezifischen Targeting unter Verwendung von geeigneten Carriersystemen, wie Immunoliposomen, Retroviruspartikeln etc. in an sich bekannter Weise verbunden, damit ein Transport zu den Zielzellen im Patienten ermöglicht wird. Dort werden sie in die Zellen inkorporiert und können dann ihre therapeutische Wirkung entfalten, d. h. auf die danach einsetzende Chemotherapie hin werden in den Tumorzellen über die induzierbaren Elemente antitumorale Substanzen in die Zellen und die Tumorumgebung freigesetzt.

Mit Hilfe der Erfindung kann die Chemotherapie also mit den antitumoralen Effekten der induzierten Proteine auf neue Weise kombiniert werden.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte agieren intrazellulär; mit einer Chemotherapie wird durch bestimmte Zytostatika über die Promotoren/Enhancer die Expression des Fremdgens induziert, das dann direkt "vor Ort" seine antitumorale Wirkung entfalten kann. Auf diesem Wege wirkt auf die Zielzelle (Tumorzelle) gleichzeitig das Zytostatikum und das Fremdgenprodukt, das darüberhinaus auch noch einen systemischen Effekt ausüben kann. Für die Cytokine z. B. bedeutet das, daß sie neben ihrer unmittelbaren zytotoxischen/zytostatischen Wirkung an der Zielzelle auch Effekte auf die Immunabwehr des Organismus haben, wie z. B. die Aktivierung von T-Lymphozyten, Macrophagen etc. Sie wirken unterstützend bei einer Tumorthherapie.

Die Erfindung soll nachstehend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel 1

Konstruktion eines Vektors CVS—SW1 zur Zytostatika-induzierbaren Expression eines therapeutisch relevanten Gens

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wird die hochmolekulare humane DNA aus in vitro-Zelllinien oder Tumormaterial in an sich bekannter Weise isoliert. Mit der PCR (1 min 94°C; 1 min 45°C; 2 min 72°C; 30 Zyklen) werden dann die unter den Ansprüchen 2a) bis d) genannten Promoter-Sequenzen des *mdr1*-Gens bzw. die unter 3. genannten Enhancer-Sequenzen des *mdr1*-Gens (Kimitoshi Kohno et al. *J. Biol. Chem.* 265 : 19690—19696, 1990) amplifiziert.

Im Falle dieses Konstruktionsbeispiels werden zur PCR der *mdr1*-Promoter-Sequenzen Primer eingesetzt (17 Basen der 5'-bzw. 3'-*mdr1*-Promotersequenz + Basen der jeweiligen Restriktionsendonukleasen + Schutzgruppe TAC), an deren 5'-Ende sich spezifische Sequenzen zur Apa I-Klonierung (GGGCCC) und am 3'-Ende Sequenzen zur Sma I (CCCGGG)- und Bgl II (AGATCT)-Klonierung befinden.

Die Amplifikation der unter Anspruch 3. genannten Enhancer-Sequenz des *mdr1*-Gens erfolgt in diesem Beispiel mit 5'-Sst II (CCGCGG)- und Sma I (CCCGGG)-Primern und 3'-Mlu I (ACGCG)-Primern (wiederum 17 Basen der 5'- bzw. 3'-*mdr1*-Enhancersequenz + Basen der jeweiligen Restriktionsendonukleasen + Schutzgruppe TAC).

Die erhaltenen Amplifikate der *mdr1*-Promoter- bzw. Enhancer-Sequenzen werden dann mit *Apa I*/*Bgl II* bzw. mit *Sst II*/*Mlu I* gespalten, gereinigt und stehen somit zur Klonierung in den Vektor N2A zur Verfügung.

Klonierung

Der retrovirale "double copy"-Vektor N2A (Petros A. Hantzopoulos et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3519—3523, 1989) mit einer Größe von 9.678 kb wird zunächst *Apa I*/*Bgl II*-gespalten und mit Amplifikaten einer *mdr1*-Promotersequenz aus a) bis d) des Anspruches 2. ligiert. Dieses Zwischenkonstrukt I wird in geeignete Bakterien transformiert und über die Methode der Plasmidamplifikation in an sich bekannter Weise aus 500ml einer Bakteriensuspension ($OD_{600}=0,4$) isoliert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt dann mit bekannten Methoden über eine *CsCl*-Gradientenzentrifugation. Durch erneute Restriktase-Spaltung mit *Apa I* und *Bgl II* wird dann aus der gewonnenen Plasmid-DNA das entsprechende Promoter-Fragment in der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und die Klonierung somit überprüft.

Dieses Zwischenkonstrukt I (Vektor N2A mit einer Zytostatikainduzierbaren *mdr1*-Promotersequenz) wird nun mit den Restriktasen *Sst II* und *Mlu I* gespalten, um die *mdr1*-Enhancer-Sequenz (5'-*Sst II*; 3'-*Mlu I*) mit dem Zwischenkonstrukt I zu ligieren. Das nun erhaltene Zwischenkonstrukt II wird wiederum in Bakterien transformiert und im Maßstab einer 500ml-Bakterienkultur vermehrt und isoliert. Die ebenfalls *CsCl*-Gradienten-gereinigte Plasmid-DNA wird zur Kontrolle der Klonierung mit *Sst II*/*Mlu I* gespalten. Die Größen der Spaltfragmente werden wiederum in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Damit steht nun ein Kassetten-Vektorsystem CVS—SW1 zur Klonierung (z. B. im *Sma I*-Ort oder im *Sna BI*-Ort) von therapeutisch interessanten Fremdgenen wie z. B. von Cytokinen, monoklonalen Antikörpern oder Antionkogenen zu deren Zytostatika-induzierbarer Expression "vor Ort" als gentherapeutisches Prinzip zur Verfügung (Abb. 1).

Induktion eines Fremdgens im Kassetten-Vektorsystem CVS—SW1

Die Induzierbarkeit eines Fremdgens im Kassetten-Vektorsystem CVS—SW1 wird am Beispiel des CAT-Gens (Chloramphenikolazetyltransferase) nach Transfektion des Konstruktes CVS—SW1 mit dem CAT-Gen in COS-Zellen mittels CAT—ELISA (Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chloramphenikolazetyltransferase in transfizierten, eukaryontischen Zellen) überprüft.

Die Testung der Induzierbarkeit eines therapeutisch-relevanten Gens erfolgt über Expressionsanalysen auf RNA— und Proteinebene und über die Testung der biologischen Aktivität entsprechend der Eigenschaften und Funktion des Fremdgenproduktes.

Liposomale Verkapselung und Applikation der Konstrukte

Die Verkapselung der Zytostatika-induzierbaren Kassetten-Vektorsysteme (z. B. CVS—SW1) mit einem therapeutisch relevanten Gen, das gewebe- bzw. tumorspezifische Targeting durch die Liposomen und die Einschleusung in *in vitro*-Zellkulturen sowie *in vivo*-Systeme (nude-Maus) erfolgt in an sich bekannter Weise nach NICOLAU (Claude Nicolau, Amelia Cudd. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems. 6: 239—271, CRC Press, Inc, 1989) und HUG (Peter Hug, Richard G. Steight. Biochim. Biophys. Acta 1097 : 1—17, 1991).

Eine perspektivische Anwendung am Krebspatienten orientiert sich an verschiedenen schon durchgeführten Studien (A. Dusty Miller. Nature 357 : 455—460, 1991).

Ausführungsbeispiel 2

In ähnlicher Weise, jedoch mit entsprechend veränderten Klonierungsorten erfolgt die Klonierung des Kassetten-Vektorsystem CVS—SW2 mit der Reihenfolge: 1. *mdr1*-Enhancer-Sequenz, *mdr1*-Promoter-Sequenz und 3. dem therapeutisch interessanten Gen. In analoger Weise sind auch andere eukaryontische Expressionsvektoren zu einer Zytostatika-induzierbaren Fremdgenexpression nutzbar. Die weiteren Schritte zur Induktion eines Fremdgens im Kassetten-Vektorsystem CVS—SW2, zur liposomalen Verkapselung des Konstruktes bis hin zur Applikation schließen sich, wie im Ausführungsbeispiel 1 genannt, an.

Patentansprüche

1. Vektor zur Expression von therapeutisch relevanten Proteinen auf der Basis von Konstrukten, die für eine Expression in Säugerzellen geeignet sind, gekennzeichnet durch einen Zytostatika-induzierbaren *mdr1*-Promoter bzw. einer definierten Sequenz davon, einem für ein therapeutisch relevantes Protein kodierendes Gen und gegebenenfalls vor oder nach dem Gen angeordnete *mdr1*-Enhancer-Elemente.
2. Expressionsvektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Sequenzen des *mdr1*-Promoters oder Teilen davon:

a) Sequenz:

CAAGG ACTGTTGAAA GTAGCAAGAG CTAGTTTGTT TTAGGTCCAT CATGTTTTAT
 5 ATTCACACTT TCATGTCAGT GGAGCAAAGA AATGGAATAC AATATAATAG AATGGTAGAA
 TCTTATTTTT AAAATCTGTG TTATTCTGAT CTTTAACTTA CTTATATCTT TGATAGAGAT
 CTTTACCTGA TGCTCAAGAT TGTAGAAATA GTATAATCAA CATAACAGTA TAGCACTGTA
 TTTATATCCT GCACTGTTTA GGGAGGGTTT AAGGCCATTC AAAAGGATAC ATAAAATACA
 ACAAGATTAC ATAAATGAAA GGTGAGATAA AGCAACAAAG CAAAACAAA GTGAAAACAG
 10 AGATCATAGG CACAAATAAG ATTA AAAAACG CATGTAATGA AGATGAAAGC TTTTACATTT
 ACCCCAGATG GACCACAGGG TTGTTGTTAA GCCTTTAAAC AGTGAACAAT GCTGTACACT
 TGCATATGCA ATTAGAACAT GTGAAAAAAA TAGTGCCCTG TTAGAAGCCT AATTAACAAT
 TTGTGAAAAA AAAAAAAGAG AGAGGCCGAG CTGTAGCTCA CGCCTGTAAT
 CCCTGCACTT TGGGAGGCCG AGGCGGGCGG ATCACGAGGT CAGGAGATCA AGACCATCCT
 15 GGCTAACACA GTGAAACCCA GTCTCTACGA AAAATACAAA AAATTAGCCG GCGCTGGTGG
 CGGGAGCCTG TAGTCCCAGC TACCTGGGAG GCTGAGGCAG GAGAATGGTG TGAACCCGGG
 AGGCGGAGCT TGCAGTGAGC CGAGATCCTG CCACTGCACT CCAGCCTGGG CGACAAAGCA
 AGCTCCGTCT GCAAAAAAGA AAAAAGAAAG AAAAACAAA GAAACTTCA TTGTATTGTA
 AGGCCAAGAA CAAAATATAT CAAGATAAGG AAAATTTGTA GTCAAGAATA GAAAAAAT
 20 ATGGCTTTGA AGTATGAGTT ATTTAAAGAA AGTGGAACA TCCTCAGACT ATGCAGTAA
 AAACAAAGTG ATTTTCTTCT TCTAAACTTA TGCAATAAAC TGATAGGTAA TATGTGAAAG
 TCATAGAATG TAGACTAGAG GATACAACAA ACCTATTTCC TCTATGTTCA TAAGAAGTAA
 GAAAAGCTCT GATGTGAGTT AGCATTGCTT TACAATTTTG AATTGTGCAG ATTGCCAGTA
 CTTTTCTTCA GTTTGAAGTA AATAGTGGAC AGGAAAAAAT ATTAATGTT GGCAGTAAAT
 25 ATGGAAGGAA ATTACAATA ATGTAATATG CTAAAACATG CTATGTTTAT TTTACTAATT
 TGAATTAAAA TGTAAGAATT TAAAATGCC TGGAAAAACA CGGGCATTGA TCTGACGTCT
 GAAGTTTAA AATATTACAC ACTTTGAAAT AGCATTTGTA CCTTGAAATA CCTGTCTCTA
 TATATTTTTT AAAACTTCCT TTTTCTTTCA TTCCATTTAT CATCAAATAA AGGATGAACA
 GATGTAACCTC AGAACTGTC AAGCATGCTG AAGAAAGACC ACTGCAGAAA AATTTCTCCT
 30 AGCCTTTTCA AAGGTGTTAG GAAGCAGAAA GGTGATACAG AATTGGAGAG GTCGGAGTTT
 TTGTATTAAAC TGTATTAAAT GCGAATCCCG AGAAAATTTT CCTTAACCTAC GTCCTGTAGT
 TATATGGATA TGAAGACTTA TGTGAACFTT GAAAGACGTG TCTACATAAG TTGAAATGTC
 CCCAATGATT CAGCTGATGC GCGTTTCTCT ACTTGCCCTT TCTAGAGAGG TGCAACGGAA
 GCCAGAACAT TCCTCCTGGA AATTCAACCT GTTTCGCAGT TTCTCGAGGA ATCAGCATTC
 35 AGTCAATCCG GGCCGGGAGC AGTCATCTGT GGTGAGGCTG ATTGGCTGGG CAGGAACAGC
 GCCGGGGCGT GGGCTGAGCA CAGCGCTTCG CTCTCTTTGC CACAGGAAGC CTGAGCTCAT
 TCGAGTAGCG GCTCTTCCAA GCTCAAAGAA GCAGAGGCCG CTGTTTCGTTT CCTTTAGGTC
 TTTCCACTAA AGTCGGAGTA TCTTCTTCCA AGATTTCACG TCTTGGTGGC CGTTC

b) Sequenz:

AGC	TTTTACATTT	ACCCAGATG	GACCACAGGG	TTGTTGTTAA	GCCTTTAAAC	
AGTGAACAAT	GCTGTACACT	TGCATATGCA	ATTAGAACAT	GTGGAAAAAA	TAGTGGCCTG	
TTAGAAGCCT	AATTAACAAT	TTGTGAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AGAGGCCGAG	5
CTGTAGCTCA	CGCCTGTAAT	CCCTGCACTT	TGGGAGGCCG	AGGCGGGCGG	ATCACGAGGT	
CAGGAGATCA	AGACCATCCT	GGCTAACACA	GTGAAACCCA	GTCTCTACGA	AAAATACAAA	
AAATTAGCCG	GGCGTGGTGG	CGGGAGCCTG	TAGTCCCAGC	TACCTGGGAG	GCTGAGGCAC	
GAGAATGGTG	TGAACCCGGG	AGGCGGAGCT	TGCAGTGAGC	CGAGATCCTG	CCACTGCACT	10
CCAGCCTGGG	CGACAAAGCA	AGCTCCGTCT	GCAAAAAAGA	AAAAAGAAAG	AAAAACAAAA	
GAAAACTTCA	TTGTATTGTA	AGGAAAAAGAA	CAAAATATAT	CAAGATAAGG	AAAATTGTGA	
GTCAAGAATA	GAAAAAAATT	ATGGCTTTGA	AGTATGAGTT	ATTTAAAGAA	AGTGGAAACA	
TCCTCAGACT	ATGCAGTAAA	AAACAAAGTG	ATTTTCTTCT	TCTAAACTTA	TGCAATAAAC	
TGATAGGTAA	TATGTGAAAG	TCATAGAATG	TAGACTAGAG	GATACAACAA	ACCTATTTCC	15
TCTATGTTCA	TAAGAAGTAA	GAAAAAGCTCT	GATGTGAGTT	AGCATTGCTT	TACAATTTTG	
AATTGTGCAG	ATTGCCAGTA	CTTTTCTCTCA	GTTTGAAGTA	AATAGTGGAC	AGGAAAAAAT	
ATTAAATGTT	GGCAGTAAAT	ATGGAAGGAA	ATTACAATA	ATGTAATATG	CTAAAAACATG	
CTATGTTTAT	TTTACTAATT	TGAATTAAAA	TGTAAGAATT	TAAAATGCC	TGGAAAAACA	
CGGGCATTGA	TCTGACGTCT	GAAGTTTTAA	AATATTACAC	ACTTTGAAAT	AGCATTGTGA	20
CCTTGAAATA	CCTGTCTCTA	TATATTTTTT	AAAACCTCTT	TTTTCTTTCA	TTCCATTTAT	
CATCAAATAA	AGGATGAACA	GATGTAACCTC	AGAACTGTCT	AAGCATGCTG	AAGAAAGACC	
ACTGCAGAAA	AATTTCTCCT	AGCCTTTTCA	AAGGTGTTAG	GAAGCAGAAA	GGTGATACAG	
AATTGGAGAG	GTCGGAGTTT	TTGTATTAAAC	TGTATTAAAT	GCGAATCCCG	AGAAAATTTT	25
CCTTAATACT	GTCTGTAGT	TATATGGATA	TGAAGACTTA	TGTGAACFTT	GAAAGACGTG	
TCTACATAAG	TTGAAATGTC	CCCAATGATT	CAGCTGATGC	GCGTTTCTCT	ACTTGCCCTT	
TCTAGAGAGG	TGCAACGGAA	GCCAGAACAT	TCCTCCTGGA	AATTCACCTT	GTTTCGCAGT	
TTCTCGAGGA	ATCAGCATTC	AGTCAATCCG	GGCCGGGAGC	AGTCATCTGT	GGTGAGGCTG	
ATTGGCTGGG	CAGGAACAGC	GCCGGGGCGT	GGGCTGAGCA	CAGCGCTTCG	CTCTCTTTGC	30
CACAGGAAGC	CTGAGCTCAT	TCGAGTAGCG	GCTCTTCCAA	GCTCAAAGAA	GCAGAGGCCG	
CTGTTGTTTT	CCTTTAGGTC	TTTCCACTAA	AGTCGGAGTA	TCTTCTTCCA	AGATTTTACG	
TCTTGGTGCC	CGTTC					

c) Sequenz:

GGG	AGGCGGAGCT	TGCAGTGAGC	CGAGATCCTG	CCACTGCACT	CCAGCCTGGG	
CGACAAAGCA	AGCTCCGTCT	GCAAAAAAGA	AAAAAGAAAG	AAAAACAAAA	GAAAACTTCA	40
TTGTATTGTA	AGGCCAAGAA	CAAAATATAT	CAAGATAAGG	AAAATTGTGA	GTCAAGAATA	
GAAAAAAATT	ATGGCTTTGA	AGTATGAGTT	ATTTAAAGAA	AGTGGAAACA	TCCTCAGACT	
ATGCAGTAAA	AAACAAAGTG	ATTTTCTTCT	TCTAAACTTA	TGCAATAAAC	TGATAGGTAA	
TATGTGAAAG	TCATAGAATG	TAGACTAGAG	GATACAACAA	ACCTATTTCC	TCTATGTTCA	
TAAGAAGTAA	GAAAAGCTCT	GATGTGAGTT	AGCATTGCTT	TACAATTTTG	AATTGTGCAG	45
ATTGCCAGTA	CTTTTCTCTCA	GTTTGAAGTA	AATAGTGGAC	AGGAAAAAAT	ATTAAATGTT	
GGCAGTAAAT	ATGGAAGGAA	ATTACAATA	ATGTAATATG	CTAAAAACATG	CTATGTTTAT	
TTTACTAATT	TGAATTAAAA	TGTAAGAATT	TAAAATGCC	TGGAAAAACA	CGGGCATTGA	
TCTGACGTCT	GAAGTTTTAA	AATATTACAC	ACTTTGAAAT	AGCATTGTGA	CCTTGAATA	50
CCTGTCTCTA	TATATTTTTT	AAAACCTCCT	TTTTCTTTCA	TTCCATTTAT	CATCAAATAA	
AGGATGAACA	GATGTAACCTC	AGAACTGTCT	AAGCATGCTG	AAGAAAGACC	ACTGCAGAAA	
AATTTCTCCT	AGCCTTTTCA	AAGGTGTTAG	GAAGCAGAAA	GGTGATACAG	AATTGGAGAG	
GTCGGAGTTT	TTGTATTAAAC	TGTATTAAAT	GCGAATCCCG	AGAAAATTTT	CCTTAATACT	
GTCTGTAGT	TATATGGATA	TGAAGACTTA	TGTGAACFTT	GAAAGACGTG	TCTACATAAG	55
TTGAAATGTC	CCCAATGATT	CAGCTGATGC	GCGTTTCTCT	ACTTGCCCTT	TCTAGAGAGG	
TGCAACGGAA	GCCAGAACAT	TCCTCCTGGA	AATTCACCTT	GTTTCGCAGT	TTCTCGAGGA	
ATCAGCATTC	AGTCAATCCG	GGCCGGGAGC	AGTCATCTGT	GGTGAGGCTG	ATTGGCTGGG	
CAGGAACAGC	GCCGGGGCGT	GGGCTGAGCA	CAGCGCTTCG	CTCTCTTTGC	CACAGGAAGC	
CTGAGCTCAT	TCGAGTAGCG	GCTCTTCCAA	GCTCAAAGAA	GCAGAGGCCG	CTGTTGTTTT	60
CCTTTAGGTC	TTTCCACTAA	AGTCGGAGTA	TCTTCTTCCA	AGATTTTACG	TCTTGGTGCC	
CGTTC						

d) Sequenz:

CTG AAGAAAGACC ACTGCAGAAA AATTTCTCCT AGCCTTTTCA AAGGTGTTAG
 GAAGCAGAAA GGTGATACAG AATTGGAGAG GTCGGAGTTT TTGTATTAAC TGTATTAAAT
 5 GCGAATCCCG AGAAAATTTT CCTTAAC TAC GTCCTGTAGT TATATGGATA TGAAGACTTA
 TGTGAACTTT GAAAGACGTG TCTACATAAG TTGAAATGTC CCAATGATT CAGCTGATGC
 GCGTTTCTCT ACTTGCCCTT TCTAGAGAGG TGCAACGGAA GCCAGAACAT TCCTCCTGGA
 AATTC AACCT GTTTCGCAGT TTCTCGAGGA ATCAGCATTC AGTCAATCCG GGCCGGGAGC
 10 AGTCATCTGT GGTGAGGCTG ATTGGCTGGG CAGGAACAGC GCCGGGGCGT GGGCTGAGCA
 CAGCGCTTCG CTCTCTTTGC CACAGGAAGC CTGAGCTCAT TCGAGTAGCG GCTCTTCCAA
 GCTCAAAGAA GCAGAGGCCG CTGTTCGTTT CCTTTAGGTC TTTCCACTAA AGTCGGAGTA
 TCTTCTTCCA AGATTTACAG TCTTGGTGGC CGTTC

3. Expressionsvektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Enhancer-Elemente des *mdr1*-Gens mit der folgenden Sequenz oder Teilen davon:

CCCTTCTAAC CATGGCCAGT GCGTGATGAC TGCTTGGGAG AGGTTATCAT TGGTGTGTCC
 20 CTTTGTGATT AGTAATCACG GGTGACTCCA CGGCAGAAAGT CAGGTACACT GGGTCTGTCA
 CTCATCCGT GAGACAGCGG GCAGGTCCCC AAAC TTCTCT GATGGTCTCT ATTTCTTGGT
 TAGTCAATGG GAGATTAAAC CAAAACCAGA GGAAACATTG TGAGCAAACC AAGAGCACCT
 CCTTGTCACC TCAGTTTATG CCGGGCCCTG GCTCCGAGCT ACTGAAACCG CAGCATGGGG
 25 GAGTCTCCTG GGTGGGGTCG ACCATTGACA GGAGGCACTG TTTAAGGCCT CACAAAACGT
 GGGCTTCCTC GCCCTGGGCC TGATGGTTCT TGAAGGCCAG GTTCCCTGCA AATCTGGCCT
 CTCTTCCAG TCAAGGCTGA AGTAAAGGGT GAGTTTCCAC TGCTTTTCAC AGTGGGTGTT
 CTGGGGGCAA GGAGCTCCCG CGAAGAAGAG GAGGAAAAC AAGCCTGGTC AGAGGGGCAC
 AGACATGTGT CCCTCTGGCC TGGTACGTCG GGACTTCAGC AGCGTCTCAG ATATCACAAT
 30 CGTCCGGGGC AGAAATTGTG ACGTGCCGCT GGGGTAGCTT GGCAGCTGTG GACACCGTTG
 CTATGTAAGG CGGGAGGTGA GTCACGTCT CCAA

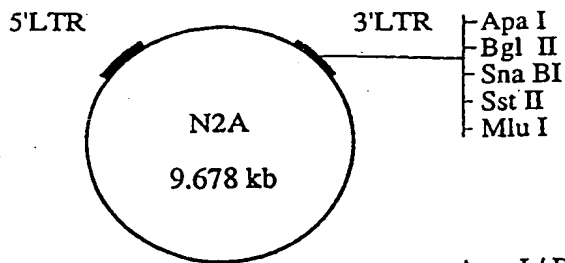
4. Expressionsvektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Gen eines Enzyms, Cytokins, Antikörpers oder Antionkogens.

5. Expressionsvektor nach Anspruch 1 und 4, gekennzeichnet durch das Gen eines Cytokins wie Tumornekrosefaktor alpha, Interferon alpha und gamma und Interleukin 2 und 6.

6. Verwendung des Expressionsvektors nach Anspruch 1—5 zur Herstellung eines Therapeutikums, gekennzeichnet durch eine Verpackung dieses Retrovirus- oder Adenovirus-abgeleiteten Vektors in Carriersystemen, bevorzugt Immunoliposomen oder Retroviruspartikeln.

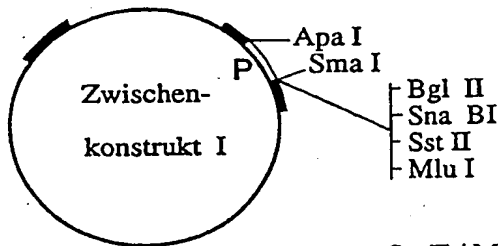
Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



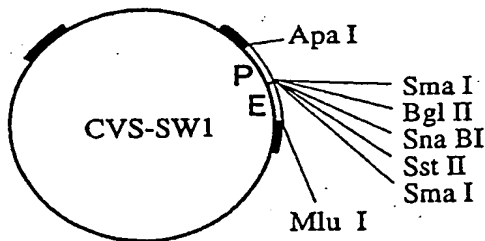
Apa I / Bgl II - Spaltung des N2A

+ 5' - Apa I - mdr1-Promotersequenz - Sma I - Bgl II - 3' P



Sst II / Mlu I - Spaltung des Zwischenkonstrukts I

+ 5' - Sst II - Sma I - mdr1-Enhancersequenz - Mlu I - 3' E



z.B. Sna BI - Spaltung des CVS-SW1

therapeutisch relevantes Gen G

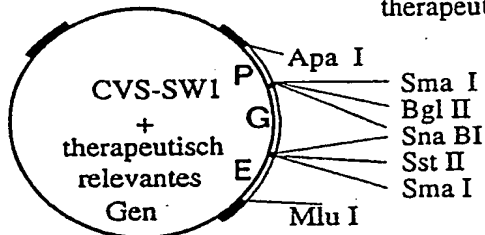


Abb. 1: Erfindungsgemäßer retroviraler Vektor CVS-SW1 mit mdr1-Promotersequenz, therapeutisch-relevantem Gen und mdr1-Enhancer-Sequenz